

알긴산의 부분적인 효소분해에 의한 특성 변화

주동식 · 이정석 · 조순영* · 신성재 · 이응호
부산수산대학교 식품공학과, *강릉대학교 식품과학과

Changes in Functional Properties of Alginic Acid by Enzymatic Degradation

Dong-Sik Joo, Jung-Suck Lee, Soon-Yeong Cho*, Sung-Jae Shin and Eung-Ho Lee

Department of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan

*Department of Food Science, Kangnung National University

Abstract

In order to expand the utility of alginic acid in the food industry, we have investigated to prepare low viscous alginic acid using a method for degradation of alginic acid with the enzyme system of *Vibrio* sp. AL-145. The enzyme showed maximum activity at pH 8.0 and 37°C, and was stable in the pH range 7.5 to 8.5 and at temperature up to 30°C, and 0.5M NaCl needed for the enzyme activity. The viscosity of alginic acid decreased with the reaction time courses regardless of alginic acid and enzyme concentration, and 90% of viscosity decreased with 60 min of reaction time, but the changes of reducing sugar not exhibited. The soluble concentration of partially degraded alginic acid(PDA) in water was about 10%(w/v), and adsorption capacity of Ca²⁺ ion increased with increasing the concentration of PDA. The alcohol concentration on precipitation of PDA was higher than Na-alginic acid.

Key words: alginic acid, viscosity, partially degraded alginic acid

서 론

알긴산은 해조 다당류의 일종으로 D-mannuronic acid와 L-guluronic acid가 β-1,4 결합 또는 α-1,4 결합으로 형성된 복합다당류이다⁽¹⁻⁴⁾. 이 알긴산은 Na-형(sodium type), 프로필렌 글리콜 에스테르 형 등이 물에 가용성으로 점성, 겔화성, 수화성, 보수성, Ca²⁺ 이온과 같은 금속이온과의 반응성, 결합성, 필름형성성 등과 같은 많은 특성을 갖고 있어서 아이스크림, 빙과, 시럽, 초콜릿 밀크, 주류, 수우프, 빵, 젤리, 푸딩, 잼, 어육 연제품, grease제, 양어사료, pet food 등에 널리 사용되고 있다^(5,6). 또한 알긴산은 식이섬유로서 중금속 체내 흡수 억제효과, 콜레스테롤 저하효과 및 정장작용을 갖고 있는 것으로 밝혀져 있다⁽⁷⁻⁹⁾.

일반적으로 시판되고 있는 수(水)가용성 알긴산은 상온에서 용해시키는데 많은 시간을 요하고, 알코올류가 포함되어 있는 용매에는 잘 녹지 않으며, 침전을 일으키는 특성이 있고, 또한 알긴산의 농도가 높아짐에 따라 필요 이상의 강한 점성을 갖게되며, 특히 액상 식품의 경우는 0.5% 이상의 농도로 첨가되면 식품 고유의 특

성을 잃게 하는 약점을 갖고 있어서 사용에 제한을 받고 있는 실정이다^(10,11). 따라서 알긴산의 특성을 유지하면서 점성이나 겔화성을 적절하게 조절할 수 있고, 용해성을 향상시킬 수 있다면 필요에 따라 첨가량의 범위를 제한하지 않아도 되고, 식품 제조시 식품의 점성이나 겔화성을 인위적으로 조절할 수 있어 알긴산의 이용범위는 훨씬 광범위해 질 것으로 판단된다. 따라서 본 연구에서는 미생물이 생산하는 알긴산 분해 효소를 이용하여 알긴산이 갖는 특성을 유지하면서 용해성을 높인 새로운 형태의 알긴산을 제조하고 그 특성을 시험하였다.

재료 및 방법

알긴산(alginic acid)

실험에 사용한 알긴산(sodium alginate)은 시판되고 있는 것(Wako Co., Japan)으로 원통형 회전 점도계(BROOKFIELD DV-11)로 점도를 측정된 결과, 3600-3700 cP(2.0% solution, 25°C)였고, 가스크로마토 그래피를 이용하여 mannuronic acid와 guluronic acid를 각각 측정하여 M/G비(mannuronic acid/guluronic acid)를 확인한 결과, 그 비가 1.31이었다.

알긴산 분해효소

알긴산 분해 효소는 주 등^(12,13)이 보고한 *Vibrio* sp. AL-

Corresponding author: Eung-Ho Lee, Department of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan, Daeyeon-dong, Namgu, Pusan 608-737, Korea

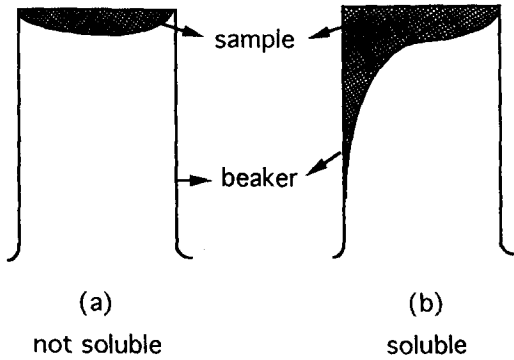


Fig. 1. The figure for determination of limit solubility of partially degraded alginate

145가 생산하는 균체의 효소를 이용하였는데, 효소는 부분정제되어 단백질 농도가 220.4 g/ml였다.

환원당 정량, 효소활성측정 및 효소의 안정성

환원당 생성량으로부터 활성을 측정하였다. 환원당은 Somogyi-Nelson법⁽¹⁴⁾에 준하여 시료용액 1 ml와 銅시약 1 ml를 시험관에 취하고, 항온수조에서 20분간 가열하여 산화제1등을 생성시켜, 여기에 몰리브덴 용액 1 ml를 가하여 발색시킨 다음, 520 nm에서 흡광도를 측정하여 표준물질로서 maltose를 이용하여 구한 표준검량선으로부터 환원당을 정량하였다. 효소 1단위는 1분간 1 mole의 환원당을 생산하는 효소량으로 정의한다. 또한 각 pH별 완충액에 효소를 60분간 투석후 효소의 잔존 활성을 측정하였고, 각 온도별 안정성은 각 온도에 효소를 먼저 30분간 가온한 후 기질을 첨가하여 잔존 활성을 측정하였다.

점도 측정

점도는 원통형 회전 점도계(BROOKFIELD DV-11)를 이용하여 각 시료의 온도를 25°C로 유지한 상태에서, 1.5 rpm의 속도로 측정하였다.

알긴산의 가용 한계 농도

가용 농도를 판별하기 위해 25°C로 조절된 증류수가 100 ml 들어있는 비이커에 각 시료를 농도별로 넣어 유리막대로 잘 저어 30분 동안 방치한 후, 비이커를 거꾸로 뒤집어 알긴산 용액이 비이커의 기벽을 타고 내리지 않는 농도를 가용 한계점으로 하였다(Fig. 1).

알긴산의 알코올 침전도

부분 분해하여 얻어진 알긴산을 시판 알긴산의 최대 가용 농도인 2.5%를 넘어선 3.0%의 농도로 만들고, 이것에 에틸 알코올의 농도를 변화시키면서 첨가하여 침전물을 원심분리하여 건조기(105±5°C)에서 2시간 동안 건조하여, 초기 용해한 알긴산의 무게에 대해 침전된

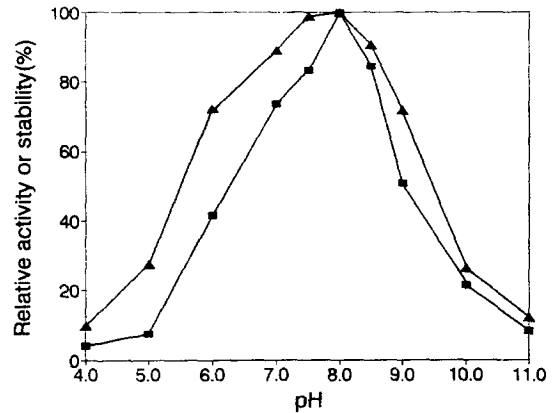


Fig. 2. pH dependence of the enzyme activity (■—■) and stability (▲—▲) of the enzyme at the different pH under preincubation condition

The used buffers in the reaction mixtures were 0.1M sodium acetate-acetate(pH 4.0-6.0), 0.1M Tris-HCl(pH 7.0-9.0), 0.1M sodium carbonate-sodium hydroxide carbonate(pH 10.0-11.0).

Reaction condition: temp. 37°C, reaction time 50 min, preincubation time 60 min.

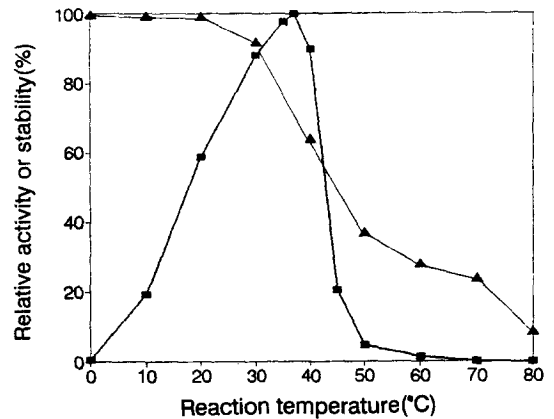


Fig. 3. Temperature dependence of the enzyme activity (■—■) and stability (▲—▲) of the enzyme at the different temperature under preincubation condition

The used buffer in the reaction mixtures was 50 mM Tris-HCl, pH 8.0. The enzyme were preincubated for 30 min at different temperature.

Reaction condition: substrate soln. 2.0 ml, enzyme 0.1 ml, reaction time 50 min.

알긴산의 건조 무게비로서 침전도(%)를 측정하였다.

알긴산의 Ca²⁺이온과의 반응성

부분 분해하여 얻은 알긴산의 Ca이온과의 반응성을 시판 알긴산과 비교하기 위해 각 시료를 농도별로 조제하고 여기에 50 mg% 농도가 되게 CaCl₂ 용액을 첨

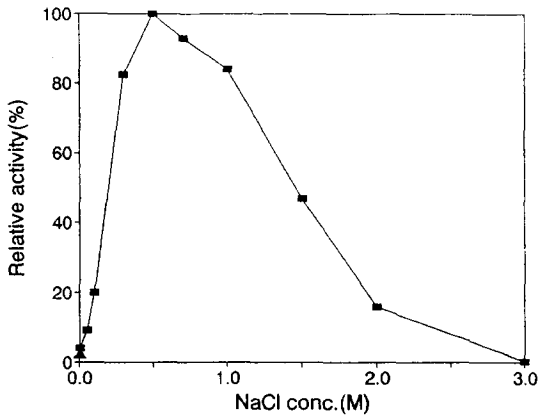


Fig. 4. Effect of NaCl concentration on the enzyme activity

Reaction conditions were the same described in Fig. 3.

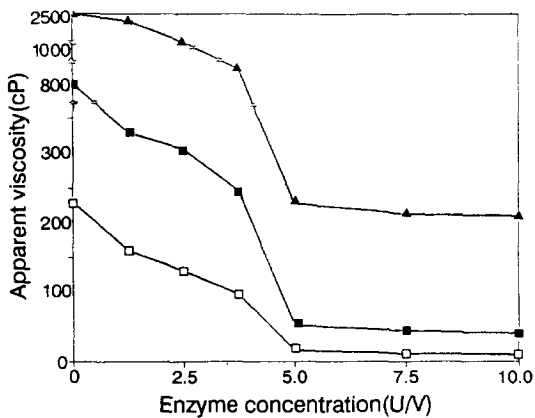


Fig. 5. Effect of enzyme concentration in viscosity decrease of Na-alginate

Reaction conditions were the same described in Fig. 3.
 Symbols: □-1.0% Na-alginate, ■-1.5% Na-alginate, ▲-2.0% Na-alginate

가하여 침전을 형성시킨 다음 원심분리하여 침전물을 제거하고 남아 있는 용액 중의 잔존 $CaCl_2$ 량을 측정하여⁽¹⁵⁾, 첨가량에 대한 잔존량의 비(%)로서 Ca^{2+} 이온과의 반응성을 시험하였다.

결과 및 고찰

효소 활성 최적 pH, 온도 및 NaCl 농도

실험에 사용한 알긴산 분해 효소의 활성 최적 조건을 시험한 결과는 Fig. 2, 3 및 4와 같다. pH 8.0에서 최대 활성을 보여 해양에서 분리한 여러 알긴산 분해 효소의 최적 활성 조건과 비슷한 결과를 나타내었으며⁽¹⁶⁾, 또한 최대 활성 영역인 pH 7.5~8.5 사이에서 효소는 안정하

Table 1. Changes of reducing sugar with various degradation time of Na-alginate

Degradation time (min)	Reducing sugar(mg/ml)		
	A ¹⁾	B	C
0	-	-	-
10	0.025	0.020	0.021
30	0.029	0.032	0.025
60	0.033	0.037	0.036
90	0.084	0.092	0.087
120	0.097	0.114	0.102
150	0.109	0.126	0.120
180	0.122	0.145	0.138
200	0.173	0.184	0.177
240	0.211	0.234	0.220

¹⁾Substrate concentration(%)

A: 1.0%, B: 1.5%, C: 2.0%

었다. 온도는 37°C에서 최대 활성을 보여, 효소 생산 조건과는 일치하지 않음을 알 수 있었고, 40°C까지는 안정한 활성을 보였다. 아울러 NaCl 농도를 달리하면서 효소 활성을 측정 한 결과, 효소 생산 조건에서와 같이 NaCl이 첨가되지 않을 경우는 전혀 활성을 나타내지 않았고, 0.5 M NaCl에서 가장 높은 활성을 보이는 호염 효소로 판단되었고⁽¹⁷⁾, 이는 균주가 해양 환경에서 분리 되었으며, 호염 효소의 활성에 1가 양이온이 요구된다는 Baxter⁽¹⁸⁾의 보고와도 일치하였다.

효소농도에 따른 점도 변화

농도가 다른 기질에 효소 첨가량을 달리하여 그때의 점도 변화로부터 부분 분해 알긴산 제조를 위한 효소 첨가 농도를 결정하기 위한 실험 결과는 Fig. 5와 같다. 기질의 농도와 관계없이 기질용액에 대해 1.5% 효소 농도까지는 완만한 점도 저하를 나타내다가 2.0% 효소 농도에서는 급격한 점도 저하를 나타내었으며 그 이상의 효소 농도에서는 점도의 변화가 거의 없었다. 이상의 결과로부터 기질 농도에 관계없이 상기 부분 정제된 효소 농도는 기질 용액에 대해 2.0%가 적절한 반응 농도임을 알 수 있었다.

반응시간에 따른 점도 변화

상기의 기질 및 효소의 반응조건에서 반응시간을 240 분까지 달리하면서 점도 변화를 측정 한 결과(Fig. 6), 초기 10분간의 반응에서 기질 농도에 관계없이 약 80% 정도의 급격한 점도 저하를 나타내었고, 반응시간 60분 이내에 반응전에 기질이 갖고 있던 점도의 90% 이상이 저하됨을 확인할 수 있었다.

반응시간에 따른 환원당의 변화

반응시간에 따른 환원당의 생성을 측정 한 결과는 Table 1과 같다. 반응시간 60분까지는 환원당 생성이

Table 2. The soluble acid concentration in water of partially degraded alginic acid

Degradation time (min)	Soluble concentration(%)				
	1	3	5	7	10
0	A* B C	A B C	A B C	A B C	A B C
10		x x x	x x x	x x x	x x x
30			x	x	x
50				x	x
70				x	x
90				x	x
110					x
150					

*Substrate concentration(%): A-1.0%, B-1.5%, C-2.0%
 **Symbols: □-soluble, x-not soluble

Table 3. The concentration of ethyl alcohol for precipitation of partially degraded alginic acid

EtOH conc. (%)	Precipitation ratio(%)						
	Control* ³	A* ¹		B		C	
1	0	10* ²	60	10	60	10	60
3	4.2	0	0	0	0	0	0
5	4.9	0	0	0	0	0	0
10	7.2	0	0	0	0	0	0
20	15.1	0	0	0	0	0	0
30	21.9	9.4	0	8.9	0	9.1	0
40	38.6	14.8	3.7	15.5	5.1	18.4	4.9
50	93.5	27.6	11.9	38.2	19.6	37.6	48.2
60	94.8	45.9	38.6	55.0	41.1	59.3	50.4
70	95.5	85.4	86.8	88.1	87.5	91.0	89.9
80	97.5	90.4	-	-	-	-	-

*¹Substrate concentration: A-1.0%, B-1.5%, C-2.0%
²Degradation time(min)
³Control is marketing alginic acid(2.5%).

거의 없음을 확인할 수 있었고, 60분 이후의 반응에서 서서히 환원당이 증가하는 것을 알 수 있다. 한편, 기질의 분해 정도는 점도저하와 환원당량으로부터 측정이 가능 한데, 본 실험에서 얻고자 하는 것은 기질의 점도만을 떨어뜨린 알긴산 즉, 환원당 형태까지는 분해가 되지 않은 부분 분해 알긴산을 필요로 하기 때문에 환원당 생성이 거의 없는 60분 이내에서 분해 시간을 결정해야 할 것으로 판단되었다.

부분 분해 알긴산의 가용 농도

분해시켜 얻어진 알긴산이 물에 몇 퍼센트까지 용해가 가능한가를 알아본 실험으로서 결과는 Table 2와 같다. 기존의 시판 알긴산이 물에 녹일 수 있는 농도가 2.0%인 것과 비교하여 보면, 반응 기질 농도가 1.0%, 1.5%인 경우는 10분간의 분해만으로 얻어진 알긴산이 10%까지

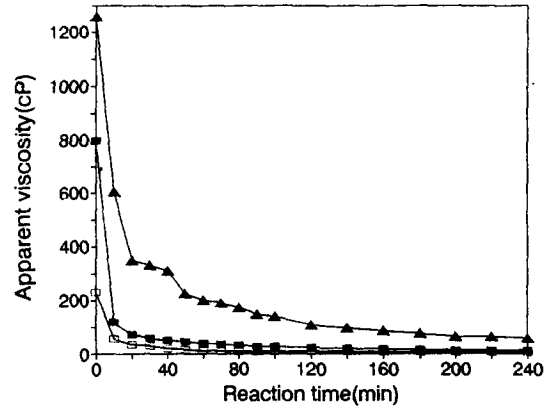


Fig. 6. Changes of viscosity with various reaction time of Na-alginic acid and enzyme

Reaction conditions were the same described in Fig. 3. Symbols: □-1.0% Na-alginic acid, ■-1.5% Na-alginic acid, ▲-2.0% Na-alginic acid

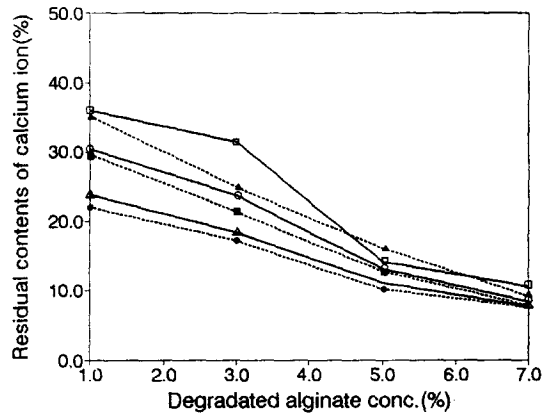


Fig. 7. Capacity of Ca²⁺-ion adsorption of partially degraded Na-alginic acid

Lines: dot (---)degradation time 10 min, solid (—)degradation time 60 min
 Symbols: □, ▲-1.0% Na-alginic acid, ○, ■-1.5% Na-alginic acid, △, ●-2.0% Na-alginic acid

녹을 수 있는 것이 확인되었고, 2.0% 기질 농도에서 얻어진 알긴산은 60분 이내로 분해시킬 경우 7.0%까지 녹일 수가 있었는데, 이러한 결과는 시판의 알긴산에 비해 가용 농도가 3.5~5배 정도 높은 것으로 나타났다. 이것은 향후 지속적인 연구로 이용성을 확인해야 하겠지만 적어도 지금까지의 시판 알긴산에 비해 첨가농도가 훨씬 자유로워져 그 이용 범위가 매우 확대될 수 있을 것으로 추정되는 결과였다.

부분 분해 알긴산의 알코올 침전도

일반적으로 알긴산은 알코올과 반응하여 탈수됨으로 침전하는데⁽¹⁹⁾, 본 실험에서 얻어진 부분 분해 알긴산의

알코올에 의한 침전도 측정 결과는 Table 3과 같다. 시료는 시간에 따른 점도와 환원당의 변화 결과(Fig. 6, Table 1)에서, 점도 저하가 80% 이상인 분해 시간 10분과 환원당 생성이 나타나기 시작하는 분해 시간 60분인 두 시료를 선택하였다. 2.5% 농도의 시판 알긴산은 알코올 3% 첨가로 침전을 시작하여 알코올 30% 첨가시 약 22%의 알긴산이 침전하였다. 그리고 알코올 농도 50% 일 때 대부분의 알긴산이 침전하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 부분 분해 알긴산은 기질 농도에 관계없이 10분 분해한 알긴산의 경우는 알코올이 30% 첨가될 때 약 9%의 침전을 나타내었고, 60분 분해 알긴산은 알코올 40% 첨가시 5% 정도가 침전되었다. 두 시험 구간 모두 70%의 알코올 농도가 될 때 약 85% 정도의 침전을 나타내었다. 이상의 결과로 시판 알긴산은 알코올 첨가 식품류에는 침전 때문에 사용에 문제가 있을 수 있으나, 본 실험에서 제조한 저점도 알긴산은 20% 농도까지 알코올이 첨가되는 식품류에도 침전없이 사용할 수 있을 것으로 판단되었다.

부분 분해 알긴산의 Ca^{2+} 이온과의 반응성

일반적으로 알긴산은 Ca^{2+} 이온과 같은 금속이온을 매개로하여 겔화하는 것으로 알려져 있는데, 이러한 알긴산을 부분적으로 분해시켰을 때 Ca^{2+} 이온과의 반응성은 떨어질 것으로 추측된다. 그러나 실험 결과 Ca^{2+} 이온과의 반응성은 분해 시간에 따라서도 차이가 있지만, 부분 분해 알긴산의 용해 농도에 따라 의존하는 값, 즉 알긴산 농도가 증가할수록 반응성이 높아지는 기존의 시판 알긴산과 같은 경향을 보였으며, 알긴산을 분해할 때의 기질 농도에 따른 차이는 커지 않음을 알 수 있었다(Fig. 7). 이러한 결과는 알긴산을 효소적으로 적당하게 분해할 경우 점도는 저하하지만, 본 연구에서와 같이 부분적 효소 분해로 인한 알긴산의 금속이온과의 반응성에는 크게 영향을 주지 않는 것으로 판단되었다. 그러나 점도 저하에 따른 금속이온과의 반응성 차이는 점도나 알콜에 의한 침전 등과 비교해 볼 때 약간의 상이한 결과를 보였는데, 이는 금속이온이 알긴산 잔기와 결합하는 부위가 부분적인 분해로 그다지 변화되지 않음을 추측할 수 있었다.

요 약

알긴산이 가지는 여러가지 물성적 특성 및 기능적 특성으로 식품에 널리 이용되고 있으나 강한 점도와 용해도 때문에 그 이용 범위가 제한적이다. 이러한 알긴산을 보다 광범위하게 식품에 이용하기 위해서 알긴산의 특성을 어느 정도 유지하면서 용해도를 높이고, 점도를 저하시킨 부분 분해 알긴산의 제조와 특성을 실험하였다. 사용된 알긴산 분해효소는 pH 8.0, 온도 37°C, 0.5 M NaCl 첨가 조건에서 최대 분해 활성을 나타내었다. 기질과 반응하는 부분 정제 효소(220.4 g/ml)의 농도는

2%(v/v)가 적절하였다. 반응 알긴산 농도에 관계없이 반응시간 10분으로 알긴산이 가지고 있는 점도 80% 정도가 저하되었고, 60분 이내에 90% 이상의 점도가 떨어졌다. 분해에 의한 환원당 생성량을 측정하여 본 결과, 반응 60분까지는 큰 변화가 없었으나, 그 이후에는 환원당이 크게 증가하였다. 분해 시간에 따라 얻어진 알긴산들의 가용 농도는 반응 알긴산의 농도가 1.0%와 1.5%의 경우 10분 정도의 분해만으로도 10% 농도까지 용해할 수 있었고, 반응 알긴산 농도가 2.0%인 경우는 10분간의 분해로 7%까지 녹일 수 있었다. 알코올 침전도를 알아본 결과, 2.5% 시판 알긴산은 알코올 농도 3%일 때 침전을 시작하여 알코올 농도 30%일 때 22%, 알코올 농도 50%에서 대부분의 알긴산이 침전하였다. 부분 분해 알긴산의 경우는 알코올 농도 30%일 때 침전하기 시작하여 알코올 농도 70%일 때 85% 정도의 알긴산이 침전하였다. Ca^{2+} 이온과의 반응성은 시판 알긴산과 마찬가지로 종류에 관계없이 부분 분해 알긴산의 농도가 높아짐에 따라 반응성도 커지는 것으로 나타났다.

감사의 말

본 연구는 1993년도 한국학술진흥재단의 자유공모과제 연구비 지원으로 이루어진 연구 결과의 일부이며, 지원에 깊이 감사드립니다.

문 헌

1. Penman, A. and Sanderson, G.R.: A method for the determination of uronic acid sequence in alginates. *Carbohydrate Research*, 25, 273 (1972)
2. Haug, A., Larsen, B. and Smidsrod, O.: Uronic acid sequence in alginate from different sources. *Carbohydrate Research*, 32, 217 (1974)
3. Drummond, D.W., Hirst, E.L. and Percival, E.: The constitution of alginic acid. *J. of Chem. Soc.*, 6, 1208 (1962)
4. Hirst, E.L., Percival, E. and Wold, J.K.: The structure of alginic acid. Part IV. Partial hydrolysis of the reduced polysaccharide. *J. of Chem. Soc.*, 8, 1493 (1964)
5. 田淵 徳一: 海藻抽出物としてのアルギンと最近の應用について. *New Food Industry*, 22, 24 (1981)
6. 金永東: 알긴산 소-다(sodium alginate)의 특성과 利用動向. *技術速報*, 57 (1985)
7. 太田靜行: ワカメ. *New Food Industry*, 29, 33 (1987)
8. 田中治夫: アルギン酸の金屬公毒への藥理的效果について. *New Food Industry*, 14, 30 (1972)
9. 李應昊: 미역 분말주스의 製造技術과 海藻類의 營養成分. *食品工業*, 73, 40 (1983)
10. Kaneko, Y., Yonemoto, Y., Okayama, K., Kimura, A. and Murata, K.: Symbiotic formation of alginate lyase in mixed culture of bacteria isolated from soil. *J. of Fer. & Bioen.*, 69, 192 (1990)
11. Takeuchi, T., Murata, K. and Kusakabe, I.: A method for depolymerization of alginate using the enzyme sy-

- stem of *Flavobacterium multivolum*. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **41**, 505 (1994)
12. 주동식, 이응호: *Vibrio* sp. AL-145가 생산하는 균체의 효소의 정제(I). *한국영양식량학회지*, **22**, 234 (1993)
 13. 주동식, 조순영, 이응호: *Vibrio* sp. AL-145가 생산하는 균체의 효소의 특성(II). *한국영양식량학회지*, **22**, 240 (1993)
 14. 日本食品工業學會: 食品分析法. 光琳, 170 (1984)
 15. 小原哲二郎 外: 食品分析ハンドブック. 建帛社, 264 (1982)
 16. Tseng, C.H., Yamaguchi, K. and Kitamikado, M.: Isolation and some properties of alginate lyase from a marine bacterium *Vibrio* sp. AL-128. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 533 (1992)
 17. Sawabe, T., Ezura, Y. and Kimura, T.: Purification and characterization of an alginate lyase from marine *Alteromonas* sp. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 521 (1992)
 18. Baxter, R.M.: An interpretation of the effects of salts on the lactic dehydrogenase of *Halobacterium salinarum*. *Can. J. Microbiol.*, **5**, 47 (1959)
 19. Mizuno, H., Saito, T., Isio, N., Onda, N., Noda, K. and Takada, K.: Mannuronic to guluronic acid ratios of alginic acids prepared from various brown seaweeds. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **49**, 1591 (1983)
-
- (1994년 8월 3일 접수)